

<h1 style="text-align: center;">Reagente LAL ricombinante</h1>		
<h2 style="text-align: center;">PyroSmart NextGen™</h2>		
<h3 style="color: #0070C0;">Istruzioni per l'uso</h3>		
	Telefono: +1 508 540 3444 Numero verde: +1 888 395 2221 Fax: +1 508 540 8680 Assistenza tecnica: +1 800 848 3248 Assistenza clienti: +1 800 525 8378	124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA <small>124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA</small>

PH002641-it Rev3

Sett 2021

PyroSmart NextGen™

Reagente cinetico-cromogenico ricombinante per il rilevamento e la determinazione quantitativa delle endotossine batteriche gram-negative (lipopolisaccaridi)

USO PREVISTO

Il saggio ricombinante PyroSmart NextGen™ può essere utilizzato come analisi alternativa alle analisi compendiali per i test su prodotto finito di farmaci iniettabili per uso umano (inclusi i prodotti biologici), farmaci iniettabili per uso veterinario e dispositivi medici (1,2,3). Le indicazioni sulla convalida dei metodi analitici alternativi sono reperibili nei documenti <1223> e <1225> (4,5) della USP e tali metodi devono risultare equivalenti o superiori ai metodi compendiali. Questo saggio può essere utilizzato anche per la determinazione quantitativa dell’endotossina nei prodotti non compendiali (ad es., materie prime, inclusa l’acqua, e per il monitoraggio di processo) senza convalida del metodo.

L’uso del saggio ricombinante PyroSmart NextGen™ non è destinato al rilevamento dell’endotossina in campioni clinici per la diagnosi delle malattie dell’uomo come, ad esempio, l’endossiemia umana.

PRINCIPIO ANALITICO

Il reagente PyroSmart NextGen™ è costituito da tre proteine ricombinanti: fattore C, fattore B ed enzima procoagulante. In presenza di endotossina, si attiva il fattore C ricombinante che a sua volta attiva il fattore B ricombinante che attiva l’enzima procoagulante ricombinante, con conseguente scissione proteolitica di un substrato cromogenico incolore formulato con PyroSmart NextGen™. La scissione del substrato libera para-nitroanilina (pNA), un composto giallo che assorbe a 405 nm (figura 1). La variazione dell’assorbanza viene misurata di continuo a intervalli regolari a 37 ± 1 °C in un tempo di esecuzione appropriato. Maggiore è la concentrazione di endotossina, maggiore è la velocità con cui la pNA viene rilasciata e di conseguenza la variazione di assorbanza risulta più rapida.

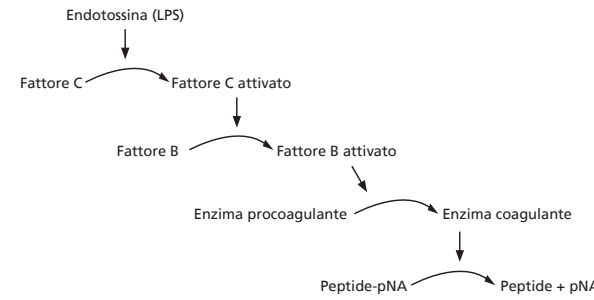


Figura 1: meccanismo a cascata che inizia con l’attivazione del fattore C indotta dall’endotossina, che a sua volta determina un aumento dell’assorbanza in seguito al rilascio di pNA

Tabella 1 - Materiali forniti con PyroSmart NextGen™

Componente	N. di fiale	Note
Reagente PyroSmart NextGen™	2	Ricostituire ciascuna fiala con 2,8 ml di tampone di ricostituzione
Tampone di ricostituzione PyroSmart NextGen™	2	-

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

La tossicità di PyroSmart NextGen™ non è stata determinata. Pertanto, è necessario prestare attenzione durante la manipolazione di PyroSmart NextGen™.

CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

La data di scadenza è riportata sulla fiala e sull’imballaggio esterno.

Tabella 2 - Condizioni di conservazione per PyroSmart NextGen™

Reagente liofilizzato	Conservare a 2-8 °C. Prima dell’uso, lasciar equilibrare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti
Tampone di ricostituzione	Conservare a 2-8 °C. Prima dell’uso, lasciar equilibrare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti
Reagente ricostituito	Temp. ambiente Utilizzare entro 3-20 minuti dopo la ricostituzione

1. ESECUZIONE DI UN TEST PYROSMART NEXTGEN™ IN UN LETTORE DI MICROPIASTRE AD ASSORBANZA

CONDIZIONI DEL SAGGIO

PyroSmart NextGen™ può essere utilizzato per quantificare la concentrazione di endotossina in due modalità.

1. *Saggio del tempo di inizio*: in cui si determina il tempo impiegato per raggiungere la soglia di OD (denominata tempo di inizio). Concentrazioni più elevate di endotossina determinano tempi di inizio più brevi. La curva standard viene costruita tracciando il logaritmo del tempo di inizio (asse Y) in funzione del logaritmo della concentrazione standard (asse X) e serve a calcolare le concentrazioni di endotossina nei campioni.

2. *Saggio della velocità*: in cui viene calcolata la velocità media (Vmean: mAbs/min) nel corso del test. Maggiori sono le concentrazioni di endotossina, più alti sono i valori di Vmean. La curva standard viene costruita tracciando la Vmean (asse Y) in funzione della concentrazione standard (asse X) e serve a determinare le concentrazioni di endotossina nei campioni.

Le impostazioni del software per entrambi i tipi di saggi sono riportate nella tabella 3.

Tabella 3 - Impostazioni del software per i saggi PyroSmart NextGen™ in un lettore di micropiastre

	Saggio del tempo di inizio	Saggio della velocità
Agitazione	10 s	10 s
Lettura	Cinetico, assorbanza	Cinetico, assorbanza
Lunghezza d’onda	405 nm	405/490 nm*
Intervallo di lettura	30 s**	30 s**
Tempo di esecuzione	60 min	30 min
Riduzione dei dati	OD di inizio = 0,03 o soglia mOD = 30	Pyros® eXpress: Vmean Gen5™; Mean V, SoftMax® Pro: Vmax

*Oppure 405/492 nm in base alla capacità del lettore di piastre

**L’intervallo può variare in base al lettore di piastre

MATERIALI E APPARECCHIATURE

I materiali forniti con PyroSmart NextGen™ sono elencati nella tabella 1. I materiali e le apparecchiature aggiuntivi necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen™ sono elencati nella tabella 4.

Tabella 4 - Materiali e apparecchiature necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen™ per i saggi nel lettore di micropiastre

Tipo di apparecchiatura	Specifica	Descrizione/N. di catalogo+
Lettore di micropiastre ad assorbanza di incubazione	In grado di mantenere una temperatura di 37 °C mentre raccoglie le letture dell’assorbanza	Ad es., BioTek® ELx808™, lettori di Molecular Devices o apparecchiature equivalenti
Software del lettore di piastre	Consente di ridurre i dati per tempo di inizio o velocità	Ad es., Pyros® eXpress o Gen5™ per ELx808™, Softmax® Pro per lettori di Molecular Devices o apparecchiature equivalenti
Endotossina standard di controllo (CSE)++	10 ng/fiala calibrati rispetto a RSE con PyroSmart NextGen™	Ad es., ACC EC010-5 o equivalente
Acqua per reagente LAL (LRW)	Senza endotossine interferenti	Ad es., ACC WP050C o equivalente
Micropiastre a 96 pozzetti	Micropiastre con coperchio, non rivestite, non trattate, senza endotossina interferente	Ad es., ACC CA961-10 o equivalente

Provette per diluizione in vetro apirogene	Senza endotossine interferenti	Ad es., ACC TB240-5, TB013-5, TB16C o equivalente
Un set di micropipette monocanale regolabili	In grado di erogare volumi di 5-20 µL, 20-100 µL e 100-1000 µL	Modelli Gilson, Rainin tradizionale o Eppendorf adatti ai puntali indicati di seguito o modelli equivalenti
Puntali per pipette	Senza endotossina interferente; in grado di erogare volumi di: 5-20 µL, 20-100 µL e 100-1000 µL	Ad es., ACC PPT25, PPT10 o equivalenti
Pipetta a ripetizione con siringhe a volumi compatibili	Erogazione automatica delle aliquote	Ad es., pipetta a ripetizione Eppendorf Xstream® con puntale combinato BioPur® da 2,5 ml o equivalente
Agitatore vortex	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Cronometro	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Parafilm M®	Il lato a contatto con la carta protettiva è generalmente privo di endotossina rilevabile.	American National Can™
Rastrelliera portaprovette	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Reggipiastre inclinato	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo

+Nota: non tutti i prodotti sono disponibili globalmente. Fare riferimento al fornitore di zona.

++Nota: il certificato di analisi e la concentrazione dichiarata su di esso sono specifici per una combinazione di PyroSmart NextGen™ e lotto di CSE. Un determinato lotto di CSE può mostrare concentrazioni diverse (EU/ng) se testato con lotti diversi di PyroSmart NextGen™. Allo stesso modo, lotti diversi di CSE avranno probabilmente concentrazioni diverse se testati con lo stesso lotto di PyroSmart NextGen™.

CONTROLLI

Controllo negativo: acqua per reagente LAL (LRW) da utilizzare come controllo negativo.

Curva standard: serie geometrica di curve standard che deve produrre l’intervallo di concentrazioni di endotossina richiesto. Alcuni esempi sono riportati nella tabella 5.

Tabella 5 - Esempi di intervalli per curve standard e impostazioni per entrambi i saggi

Saggio del tempo di inizio		
Concentrazione di CSE (o RSE) in EU/ml	Volume di LRW	Soluzione CSE (o RSE) in EU/ml
50	-	-
5	900 µL	100 µL di 50 EU/ml
0,5	900 µL	100 µL di 5 EU/ml
0,05	900 µL	100 µL di 0,5 EU/ml
0,005	900 µL	100 µL di 0,05 EU/ml

Saggio della velocità		
Concentrazione di CSE (o RSE) in EU/ml	Volume di LRW	Soluzione CSE (o RSE) in EU/ml
0,1	1960 µL	40 µL di 5 EU/ml
0,05	500 µL	500 µL di 0,1 EU/ml
0,025	500µL	500 µL di 0,05 EU/ml
0,0125	500 µL	500 µL di 0,025 EU/ml
0,00625	500 µL	500 µL di 0,0125 EU/ml

Controlli positivi del prodotto (PPC): i PPC sono controlli di idoneità (inibizione/attivazione) e sono costituiti da un campione (o una diluizione del campione) a cui viene aggiunta l’endotossina standard. L’endotossina aggiunta deve produrre una concentrazione che ricade nella porzione centrale della curva standard. Ad esempio, se la curva standard è compresa nell’intervallo 50-0,005 EU/ml, aggiungere 50 µL di campione con 5 uL di soluzione 5 EU/ml per ottenere una concentrazione finale di 0,5 EU/ml. Se la curva standard è compresa nell’intervallo 0,1-0,00625 EU/ml, aggiungere 50 µL di campione con 5 µL di soluzione 0,5 EU/ml per ottenere una concentrazione finale di 0,05 EU/ml.

PROCEDURA DI ANALISI

1. Accendere il lettore di piastre per lasciarlo equilibrare a 37 °C.

2. Configurare il software con le apposite impostazioni (vedere la tabella 3).

3. Preparare i controlli e i campioni appropriati.

4. Preparare la sessione del test come mostrato nella figura 2.

L’impostazione del test è descritta di seguito in maniera più dettagliata.

5. Leggere il test.

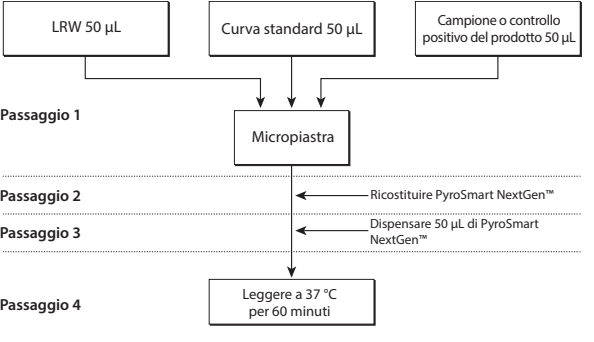


Figura 2 - Uno schema della procedura di analisi per i saggi nel lettore di micropiastre

PASSAGGIO 1 - Trasferire il campione di analisi

Trasferire 50 µL di campione di analisi (2 controlli negativi, 2 serie standard di endotossina, 2 diluizioni del campione e 2 PPC per ciascuna diluizione del campione) negli appositi pozzetti della micropiastro come impostato nel software nel layout della piastra.

PASSAGGIO 2 - Ricostituire il reagente LAL ricombinante PyroSmart NextGen™
Lasciar equilibrare il reagente e il tampone di ricostituzione a temperatura ambiente. Picchiettare leggermente la fiala di reagente in modo da far cadere sul fondo il materiale sciolto. Eliminare il vuoto in maniera asettica sollevando il tappo. Gettare il tappo. Trasferire 2,8 ml di tampone di ricostituzione PyroSmart NextGen™ nella fiala di reagente e coprire con Parafilm. Agitare leggermente la fiala per il primo minuto, quindi lasciar riposare per i 2 minuti successivi (per un totale di 3 minuti di ricostituzione prima dell’uso). Non miscelare di nuovo prima dell’uso per evitare una quantità eccessiva di schiuma e una perdita di sensibilità. Se si ricorre a una miscelazione eccessiva, lasciar riposare per 10 minuti o utilizzare una pipetta manuale per dispensare, per evitare la formazione di bolle. Il reagente deve essere utilizzato entro 20 minuti dopo la ricostituzione.

PASSAGGIO 3 - Dispensare PyroSmart NextGen™ nella micropiastro

Rimuovere il coperchio della piastra. Riempire un puntale combinato sterile con il reagente ricostituito e impostare per erogare aliquote da 50 µL, un’aliquota alla volta. Evitare la contaminazione crociata utilizzando la pipetta con un’angolazione di 45° per dispensare il reagente sul lato del pozzetto. Con una pipetta elettronica si consiglia una velocità di erogazione pari o inferiore a 5 per evitare la formazione di bolle. Iniziare ad aggiungere ai controlli negativi e a seguire agli standard, partendo da quelli a minore concentrazione per poi arrivare a quelli con concentrazione massima; aggiungere infine a tutti i campioni. Procedere il più rapidamente possibile (l’operazione deve durare non più di 30 secondi). Riposizionare il coperchio sulla piastra.

PASSAGGIO 4 - Leggere il test

Trasferire la micropiastro in un lettore di piastre. Togliere il coperchio della piastra e chiudere il lettore. Avviare il test.

2. ESECUZIONE DEL TEST PYROSMART NEXTGEN™ NEL LETTORE DI PROVETTE PYROS® KINETIX FLEX

CONDIZIONI DEL SAGGIO

PyroSmart NextGen™ può essere utilizzato per quantificare la concentrazione di endotossine in qualità di *saggio del tempo di inizio*: in cui si determina il tempo impiegato per raggiungere la soglia di OD (denominata tempo di inizio). Concentrazioni più elevate di endotossina determinano tempi di inizio più brevi. La curva standard viene costruita tracciando il logaritmo del tempo di inizio (asse Y) in funzione del logaritmo della concentrazione standard (asse X) e serve a calcolare le concentrazioni di endotossina nei campioni.

Le impostazioni per il software del lettore di provette sono descritte nella tabella 6 o nella figura 3 in base al tipo di software utilizzato.

Tabella 6 - Impostazioni del software Pyros® EQS per i saggi PyroSmart NextGen™

 	Impostazioni generali
Letture	Cinetico, assorbanza
Lunghezza d’onda	405 nm
Intervallo di lettura	10 s
Tempo di esecuzione	80 min
Riduzione dei dati	Soglia mOD = 20
Regolazione del basale	Attiva, 125-325 secondi

Impostazioni specifiche per Pyros® eXpress:

*Name PyroSmart NextGen - Tube Reader	Instrument Tube Reader	Tube	*ADC Zero Start (s) 30	*ADC Zero End (s) 90				
Read Interval (s) 10	Primary Wavelength (nm) 405	Reference Wavelength (nm)	*OD Threshold (mOD) 20	*OD LR window (s) 30				
Assay Type <input checked="" type="radio"/> Onset <input type="radio"/> Vmean <input type="radio"/> Vmax	*Maximum Test Time (s) 4800	Standard Curve EU/mL <input type="button" value="Log"/> <input checked="" type="checkbox"/> Log Concentrations <input type="checkbox"/> Indicator	*OD Zero Start (s) 120	*OD Zero End (s) 170				
Reagent PyroSmart NextGen	*Default Standard Concentrations <table><tbody><tr><td>1</td><td>0,1</td><td>0,01</td><td>0,001</td></tr></tbody></table>	1	0,1	0,01	0,001	Negative Control 10		
1	0,1	0,01	0,001					

Figura 3: impostazioni del software Pyros® eXpress per i saggi PyroSmart NextGen™

MATERIALI E APPARECCHIATURE

I materiali forniti con PyroSmart NextGen™ sono elencati nella tabella 1. I materiali e le apparecchiature aggiuntivi necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen™ sono elencati nella tabella 7.

Tabella 7 - Materiali e apparecchiature necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen™ per i saggi nel lettore di provette

Tipo di apparecchiatura	Specifica	Descrizione/N. di catalogo+
Lettore di provette per incubazione	In grado di mantenere una temperatura di 37 °C mentre raccoglie le letture dell’assorbanza	Pyros® Kinetix Flex
Software del lettore di provette	Consente di ridurre i dati per tempo di inizio	Pyros® eXpress o Pyros® EQS
Endossina standard di controllo (CSE)++	10 ng/fiala calibrati rispetto a RSE con PyroSmart NextGen™	Ad es., ACC EC010-5 o equivalente
Acqua per reagente LAL (LRW)	Senza endotossine interferenti	Ad es., ACC WP050C o equivalente
Provette di reazione apiogene da 8x75 mm	Vetro borosilicato, privo di endotossine interferenti	Ad es., ACC TK100-10 o equivalente
Provette per diluizione in vetro apiogene	Senza endotossine interferenti	Ad es., ACC TB240-5, TB013-5, TB16C o equivalente
Un set di micropipette monocanale regolabili	In grado di erogare volumi di 5-20 µL, 20 µL-100 µL e 100-1000 µL	Modelli Gilson, Rainin tradizionale o Eppendorf adatti ai puntali indicati di seguito o modelli equivalenti
Puntali per pipette	Senza endossina interferente; in grado di erogare volumi di: 5-20 µL, 20-100 µL e 100-1000 µL	Ad es., ACC PPT25, PPT10 o equivalenti
Pipetta a ripetizione con siringhe a volumi compatibili	Erogazione automatica delle aliquote	Ad es., pipetta a ripetizione Eppendorf Xstream® con puntale combinato BioPur® da 2,5 ml o equivalente
Agitatore vortex	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Cronometro	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Parafilm M®	Il lato a contatto con la carta protettiva è generalmente privo di endotossina rilevabile.	American National Can™

Rastrelliera portaprovette	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Rastrelliere portaprovette per provette di reazione	Fornite con PK Flex	

+Nota: non tutti i prodotti sono disponibili globalmente. Fare riferimento al fornitore di zona.

++Nota: il certificato di analisi e la concentrazione dichiarata su di esso sono specifici per una combinazione di PyroSmart NextGen™ e lotto di CSE. Un determinato lotto di CSE può mostrare concentrazioni diverse (EU/ng) se testato con lotti diversi di PyroSmart NextGen™. Allo stesso modo, lotti diversi di CSE avranno probabilmente concentrazioni diverse se testati con lo stesso lotto di PyroSmart NextGen™.

CONTROLLI

Controllo negativo: acqua per reagente LAL (LRW) da utilizzare come controllo negativo.

Curva standard: serie geometrica di curve standard che deve produrre l’intervallo di concentrazioni di endotossina richiesto. Per un esempio, fare riferimento alla tabella 8.

Tabella 8 - Esempi di intervalli e impostazione per curve standard

Concentrazione di CSE (o RSE) in EU/ml	Volume di LRW	Soluzione di CSE (o RSE) in EU/ml
50	-	-
1	4900 µL	100 µL di 50 EU/ml
0,1	900 µL	100 µL di 1 EU/ml
0,01	900 µL	100 µL di 0,1 EU/ml
0,001	900 µL	100 µL di 0,01 EU/ml

Controlli positivi del prodotto (PPC): i PPC sono controlli di idoneità (inibizione/ attivazione) costituiti da un campione (o una diluizione del campione) a cui viene aggiunta l’endossina standard. L’endossina aggiunta deve produrre una concentrazione che ricade nella porzione centrale della curva standard. Ad esempio, se la curva standard è compresa nell’intervallo 1-0,001 EU/ml, aggiungere 200 µL di campione con 20 µL di soluzione 1 EU/ml per ottenere una concentrazione finale di 0,1 EU/ml.

PROCEDURA DI ANALISI

- Accendere il lettore di provette per lasciarlo equilibrare a 37 °C.
- Impostare il software utilizzando le impostazioni appropriate (vedere la tabella 6 per Pyros® EQS o la figura 3 per Pyros® eXpress) per il software specifico in uso.
- Preparare i controlli e i campioni appropriati.
- Preparare la sessione del test come mostrato nella figura 4. L’impostazione del test è descritta di seguito in maniera più dettagliata.
- Leggere il test.

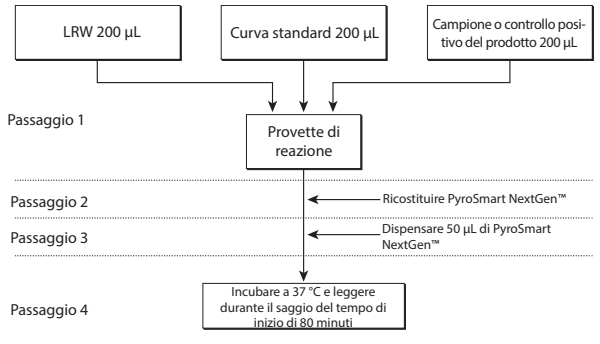


Figura 4 - Uno schema della procedura di analisi per i saggi nel lettore di provette

PASSAGGIO 1 - Trasferire il campione di analisi

Trasferire 200 µL di campione di analisi (2 controlli negativi, 2 serie standard di endotossina, 2 diluizioni del campione e 2 PPC per ciascuna diluizione del campione) nelle apposite provette di reazione come impostato nel layout del software.

PASSAGGIO 2 - Ricostituire il reagente LAL ricombinante PyroSmart NextGen™

Lasciar equilibrare il reagente e il tampone di ricostituzione a temperatura ambiente. Picchiettare leggermente la fiala di reagente in modo da far cadere sul fondo il materiale sciolto. Eliminare il vuoto in maniera asettica sollevando il tappo. Gettare il tappo. Trasferire 2,8 ml di tampone di ricostituzione PyroSmart NextGen™ nella fiala di

reagente e coprire con Parafilm. Agitare leggermente la fiala per il primo minuto, quindi lasciar riposare per i 2 minuti successivi (per un totale di 3 minuti di ricostituzione prima dell’uso). Non miscelare di nuovo prima dell’uso per evitare una quantità eccessiva di schiuma e una perdita di sensibilità. Se si ricorre a una miscelazione eccessiva, lasciar riposare per 10 minuti o utilizzare una pipetta manuale per dispensare, per evitare la formazione di bolle. Il reagente deve essere utilizzato entro 20 minuti dopo la ricostituzione.

PASSAGGIO 3 - Erogare PyroSmart NextGen™ alle provette di reazione

Riempire un puntale combinato sterile con il reagente ricostituito e impostare per erogare aliquote da 50 µL, un’aliquota alla volta. Con la pipetta posizionata a un angolo di 45 gradi rispetto alla provetta di reazione (evitando, al contempo, di toccare le pareti interne della provetta), erogare 50 µL del reagente al primo replicato del controllo negativo. Agitare la provetta per 1 secondo e inserirla immediatamente all’interno del pozzetto n.1 nel lettore di provette. Ripetere questa procedura per le provette rimanenti dei controlli negativi, quindi continuare con la curva standard: dalla concentrazione più bassa a quella più alta, una provetta alla volta. In seguito continuare con la sessione dei campioni.

PASSAGGIO 4 - Leggere il test

Il test si avvia automaticamente con l’inserimento di ogni provetta. Consentire il completamento della sessione del test.

CRITERI DI VALIDITÀ PER L'ESECUZIONE DEI SAGGI PER TUTTI I SAGGI

Per garantire la validità della sessione, devono essere soddisfatte le condizioni riportate nella tabella 9.

Tabella 9 - Esempi di intervalli per curve standard e impostazioni per tutti i saggi

Criteria	Validità
Controllo negativo	<i>Saggio del tempo di inizio</i> : il tempo di inizio dei controlli negativi deve essere maggiore rispetto a quello dello standard meno concentrato. <i>Saggio della velocità (si applica solo al metodo con lettore di piastre)</i> : la Vmean del controllo negativo deve essere minore rispetto a quella dello standard meno concentrato. Deve essere minore o uguale a 1,0 mAbs/min
Curva standard	La curva standard deve avere un valore assoluto del coefficiente di correlazione ≥ 0,980.
Controlli positivi del prodotto	Il recupero del controllo positivo del prodotto deve essere del 50%~200% della concentrazione nominale dell’endotossina aggiunta.

RISULTATI

Tutti i calcoli descritti in questa sezione vengono eseguiti automaticamente dal software opportunamente configurato. Per ulteriore assistenza contattare i servizi tecnici all’indirizzo techservice@acciusa.com

Calcolo delle concentrazioni di endotossina

Le concentrazioni di endotossine di tutti i campioni dei test (compresi gli standard e i controlli) vengono calcolate tramite interpolazione rispetto alla curva standard utilizzando l’equazione per una linea dritta come segue:

- Saggio del tempo di inizio***:
Log concentrazione di endotossina = (log tempo di inizio – intercetta di Y) / pendenza

- Saggio della velocità (si applica solo al metodo con lettore di piastre)***:
Concentrazione di endotossina = (Vmean – intercetta di Y) / pendenza

Per i saggi del tempo di inizio è possibile utilizzare anche la regressione polinomiale.

Recupero di PPC per i campioni addizionati

% di recupero del PPC = ((Concentrazione media nel campione addizionato – Concentrazione media nel campione non addizionato) / (Concentrazione nominale dell’aggiunta)) x 100%

Concentrazione finale di endotossina nei campioni non addizionati

Moltiplicare la concentrazione di endotossina rilevata nel campione diluito per il fattore di diluizione per esprimere la concentrazione nel campione originale prima della diluizione.

LIMITAZIONI DELLE PROCEDURE

Le procedure sono limitate dal grado di inibizione o di attivazione dimostrato dal campione in esame. Le sostanze che denaturano le proteine, chelano gli ioni, legano l'endotossina o alterano lo stato idrofobico dell'endotossina possono causare interferenza

nel test. L’interferenza può essere rilevata come % di recupero del PPC che ricade fuori dall’intervallo del 50-200%. Nella maggioranza dei casi, la diluizione del campione riduce la concentrazione e l’attività delle sostanze interferenti. I campioni devono essere diluiti in LRW senza superare la massima diluizione valida che è calcolata in base ai requisiti di farmacoepa (6, 7, 8 o 9).

Altre sostanze interferenti:

- Alcune proteasi serine (ad es., tripsina, fattori sanguigni attivati) che generano un risultato falso positivo devono essere denaturate (ad esempio, mediante trattamento termico) prima di effettuare il test.**

- Materiali colorati come, ad esempio, siero animale, albumina e plasma**

- Eccessiva torbidità**

Se non è possibile convalidare la procedura (1, 2, 3) a una diluizione del campione che non superi la massima diluizione valida, il test ricombinante non può essere utilizzato come test alternativo.

BIBLIOGRAFIA

- Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Luglio 2012.
- Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Endotoxin Measurement Test Using Recombinant Proteins, Japanese Pharmacopeia, 18th Edition, Tokyo, Japan.
- Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopeia 2.4.16 (revisione corrente), European Pharmacopeia Commission, Strasbourg, France.
- Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopoeia (revisione corrente), Tokyo, Japan.
- Medical Devices – Pyrogen and Endotoxins Testing <161>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Bibliografia aggiuntiva:

Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. Innate Immunity, 23, 136-146 (2017)

Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J *and et. al.*

Application of a Recombinant Three-Factor Chromogenic Reagent for BET filed in the Pharmacopeias. Biol Pharm Bull (2019)42(12)2024-2037

Muroi M, Ogura N *et. al.*

Per qualsiasi domanda sull'utilizzo di PyroSmart NextGen™, contattare i servizi tecnici all’indirizzo techservice@acciusa.com